

Modulação da Expressão dos Receptores de Retinoides durante a Diferenciação Neuronal induzida por Ácido Retinoico

Introdução

A doença de Parkinson (DP), uma das doenças neurodegenerativas mais comuns na população mundial, está principalmente associada com a degeneração de neurônios dopaminérgicos. Os tratamentos baseados na reposição da função neuronal, como terapias baseadas em células-tronco, figuram como as abordagens mais promissoras à DP; no entanto, o desenvolvimento e a otimização dessas terapias dependem da melhor compreensão dos mecanismos moleculares por trás da diferenciação neuronal.

A diferenciação *in vitro* de linhagens celulares com potencial neurogênico é, atualmente, a principal estratégia empregada na investigação dos mecanismos moleculares da diferenciação neuronal. Para a indução da diferenciação são empregados fatores neuromorfogênicos tais como o ácido retinoico e neurotrofinas como NGF, GDNF e BDNF.

O AR, que é o principal metabólito da vitamina A, promove a diferenciação e a parada no ciclo celular das células indiferenciadas principalmente por intermédio de receptores nucleares: os receptores de AR (RAR α , RAR β , RAR γ) e os receptores de 9-*cis*-AR, um isômero da molécula (RXR α , RXR β , RXR γ). Quando ativados por AR, eles formam tanto homo- quanto heterodímeros e atuam diretamente como fatores de transcrição, modulando a expressão gênica pela interação com elementos responsivos a AR (RAREs) no DNA e atuando em mecanismos não genômicos pela interação com outros fatores celulares.

Objetivo

Tendo em vista a melhor compreensão dos mecanismos por trás da diferenciação neuronal, foi investigada a diferenciação induzida por ácido retinoico (AR) da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y quanto aos níveis de expressão e à localização celular dos RARs e RXRs durante a diferenciação neuronal e quanto à importância dos receptores para o processo.

Metodologia

As células SH-SY5Y foram cultivadas em meio DMEM-F12 (1:1) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram diferenciadas com AR (10 μ M) em meio 1% SFB durante 7 dias, com trocas de meio a cada 3 dias. Como controle foi utilizado tratamento com volumes equivalentes do veículo dimetilsulfóxido (DMSO).

Os níveis de expressão dos receptores de retinoides ao longo da diferenciação foram avaliados: o imunocontéudo das isoformas de RAR e RXR foi determinado por *western blot* e foi realizado RT-PCR quantitativo para a avaliação dos níveis de mRNA dos receptores. A análise estatística foi realizada por teste Tukey. Além disso, foi analisada a localização celular dos receptores por imunocitoquímica.

A importância dos receptores de retinoides para a viabilidade celular e para a diferenciação foi avaliada por meio do silenciamento das diferentes isoformas com a utilização de siRNA.

Resultados

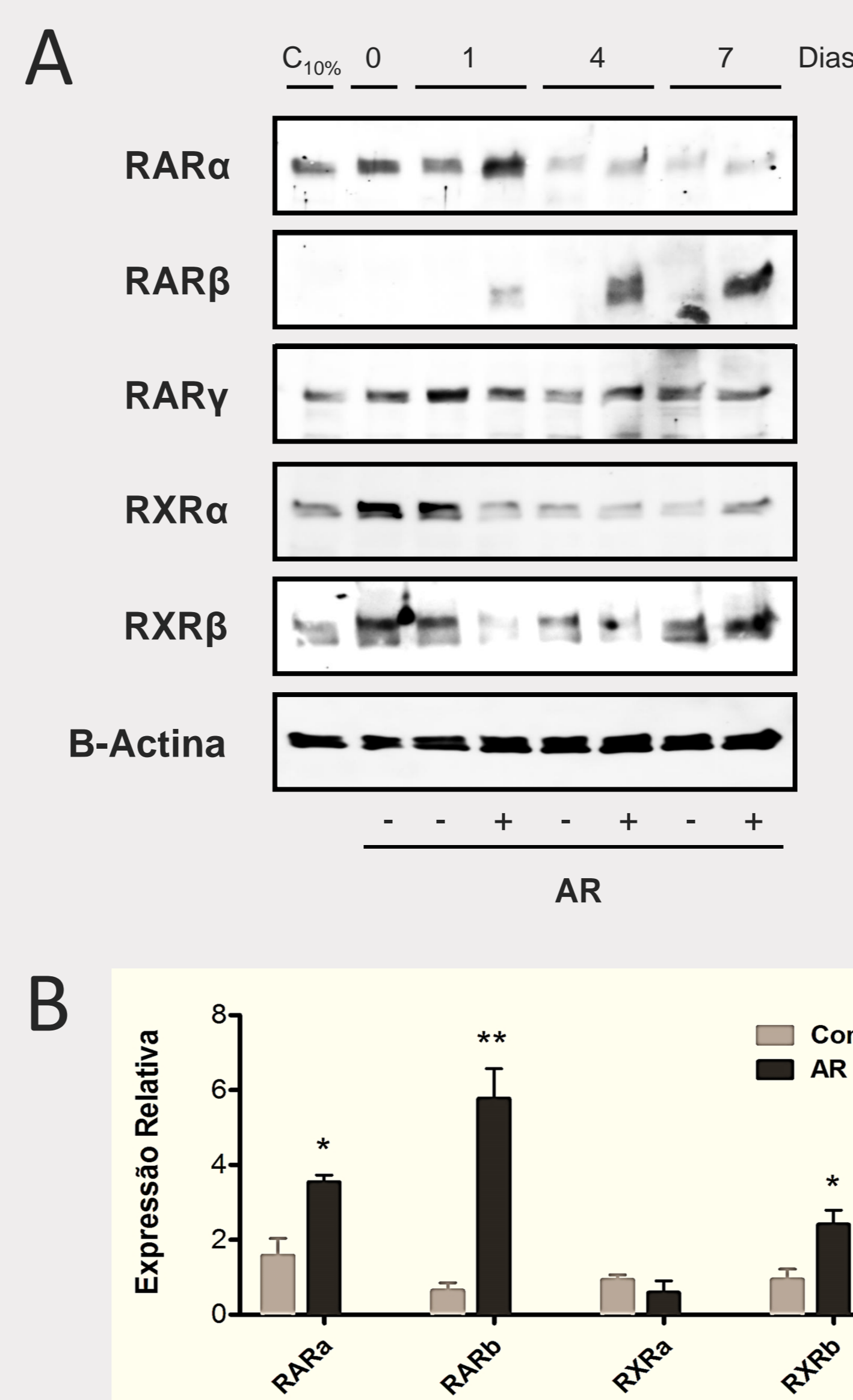


Figura 1: Expressão das isoformas dos receptores durante a diferenciação induzida por ácido retinoico. Imunocontéudo de RAR α , RAR β , RAR γ , RXR α and RXR β ao longo da diferenciação mediada por AR (10 μ M) (A), com células proliferativas usadas como controle (C_{10%}) e com células ambientadas com meio 1% SFB antes do tratamento (0). Níveis de expressão do mRNA de RAR α , RAR β , RXR α and RXR β nos grupos controle e tratado no dia 7 (B). Valores normalizados pelos níveis de GAPDH e relativos às células SH-SY5Y proliferativas. *P-valor < 0,01; **P-valor < 0,001.

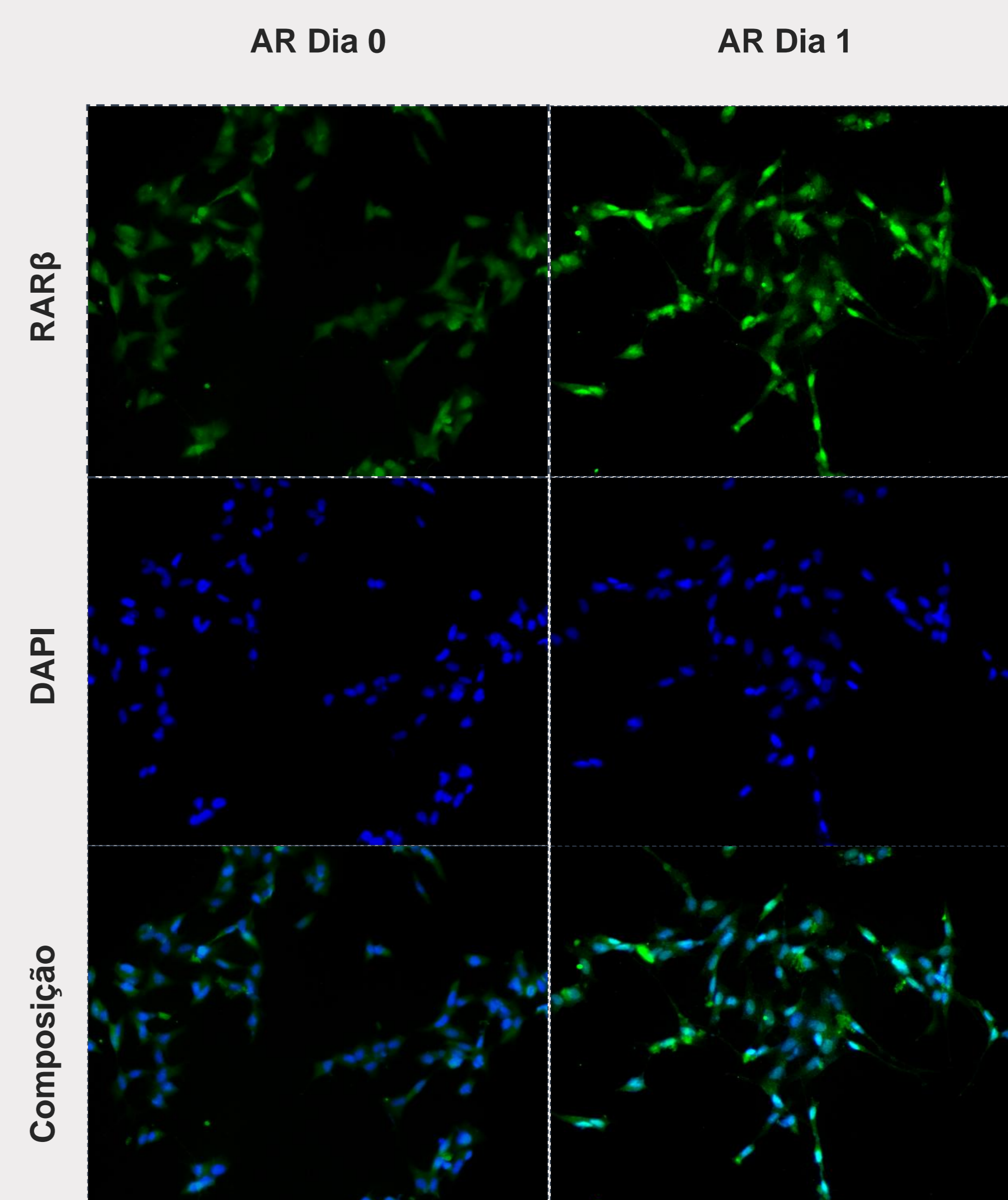


Figura 2: Localização celular de RAR β na diferenciação induzida por ácido retinoico. Imunocitoquímica das células SH-SY5Y antes do tratamento (Dia 0) e após 1 dia de diferenciação com AR (Dia 1) da isoforma RAR β e do corante DAPI. A composição das duas imagens foi obtida pelo software ImageJ.

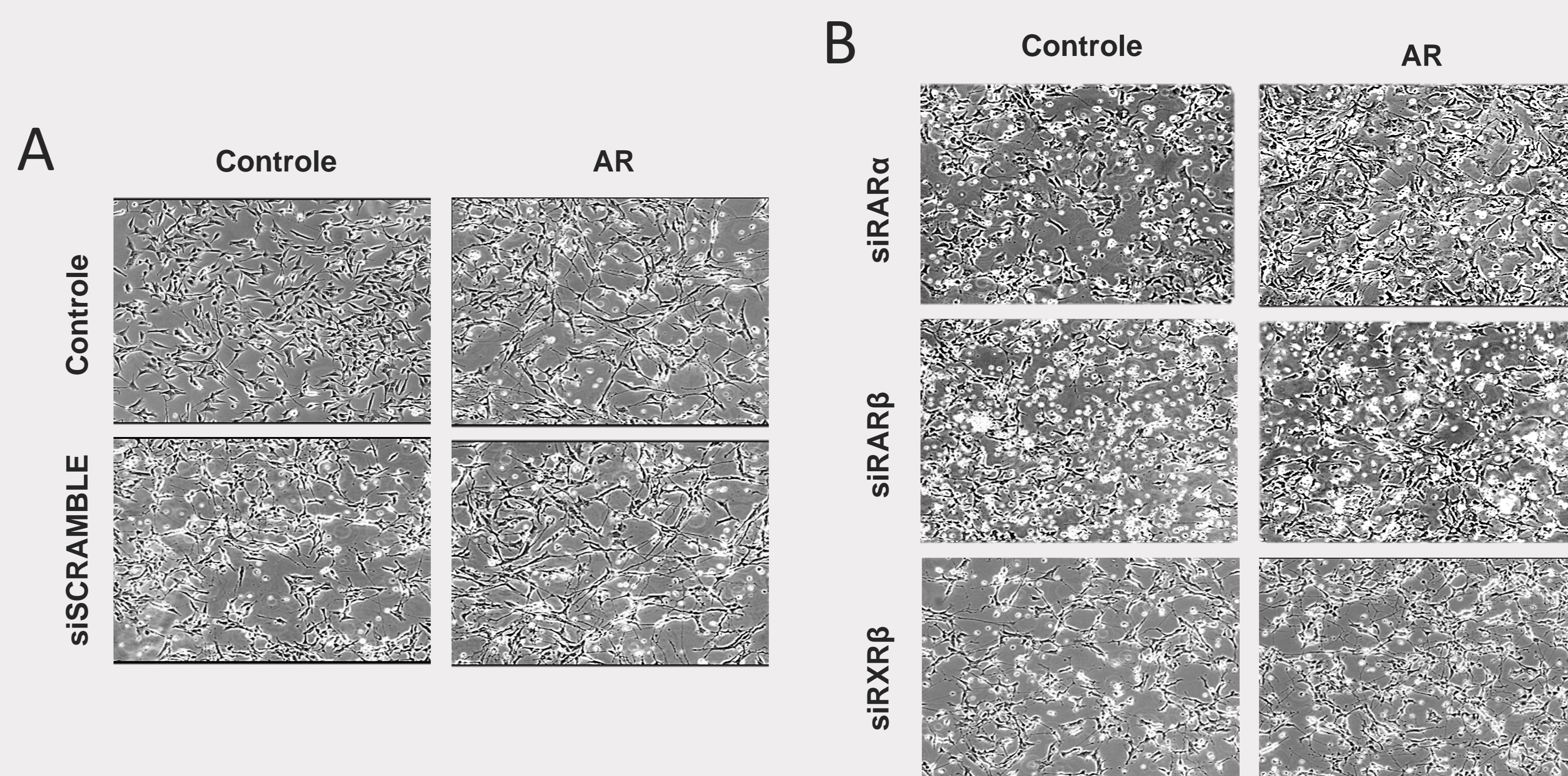


Figura 3: Silenciamento das isoformas dos receptores de retinoides. Células controle e diferenciadas sem o processo de transfecção ou transfectadas com siRNA Scramble (A), com siRAR α , siRAR β ou siRXR β (B). As células SH-SY5Y foram incubadas com siRNA (50nM) durante 2 dias e, então, submetidas ao protocolo de diferenciação durante 7 dias.

Conclusão

As diferentes isoformas de RAR de RXR demonstraram níveis de expressão variados ao longo da diferenciação neuronal induzida por AR, o que confirma análises preliminares de dados de microarranjo disponíveis no Gene Expression Omnibus (GEO accession: GSE9169). Além disso, a análise por imunocitoquímica demonstrou a mudança da localização celular do RAR α mediada por AR, com o recrutamento da isoforma para o núcleo em 1 dia de tratamento.

O silenciamento de isoformas únicas mediado por siRNA resultou em múltiplos efeitos para a diferenciação: o silenciamento de RAR α e de RAR β resulta em disfunções na viabilidade celular e na emissão prolongamentos neuríticos enquanto o silenciamento de RXR β parece favorecer a emissão de neuritos de forma independente do AR.

Os resultados demonstram a capacidade do AR em promover alterações nos níveis de expressão e na localização celular dos RARs e RXRs, e essa modulação parece ser importante na determinação do destino celular durante a diferenciação das células SH-SY5Y.